

Ref. 5'

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-127300

(43)Date of publication of application : 19.05.1998

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C07H 21/04
G01N 21/64
// C12N 15/09
G01N 33/566

(21)Application number : 08-290235

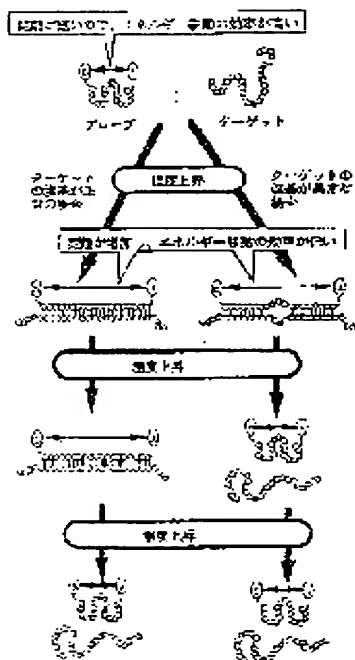
(71)Applicant : HAMAMATSU PHOTONICS
KK

(22)Date of filing :

31.10.1996

(72)Inventor : HIRANO KENICHI

(54) DETECTION OF POINT MUTATION OF NUCLEIC ACID AND DETECTION OF ABNORMALITY OF GENE BY USING THE SAME



(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect a point mutation by allowing a probe having a sequence complementary to a specific sequence in a nucleic acid and labeled at the both terminal with different fluorochromes causing transfer of a fluorescence resonance energy to coexist with a nucleic acid and measuring the ratio of the luminescent degree of the different fluorochromes.

SOLUTION: This method for detecting a point mutation existing in a specific sequence in the target nucleic acid comprises a step for preparing a probe having a base sequence complementary to the two specific sequence in the target nucleic acid, further having one terminal labeled by one of two kinds of fluorochromes causing transfer of a fluorescence resonance energy and the other terminal labeled by the other fluorochrome of the two kinds of the fluorochromes and a step for measuring the ratio of the luminescent degree

at the maximum fluorescence-absorbing wave length of one fluorochrome to the luminescent degree at the maximum fluorescence-absorbing wave length of the other fluorochrome while coexisting the probe with the target nucleic acid at a temperature higher than the room temperature to detect the point mutant being in the specific sequence of the target sequence.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-127300

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月19日

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C12Q 1/68

C12Q 1/68

A

C07H 21/04

C07H 21/04

B

G01N 21/64

G01N 21/64

Z

// C12N 15/09

ZNA

33/566

G01N 33/566

C12N 15/00

ZNA

A

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全14頁)

(21) 出願番号

特願平8-290235

(22) 出願日

平成8年(1996)10月31日

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 平野 憲一

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ

トニクス株式会社内

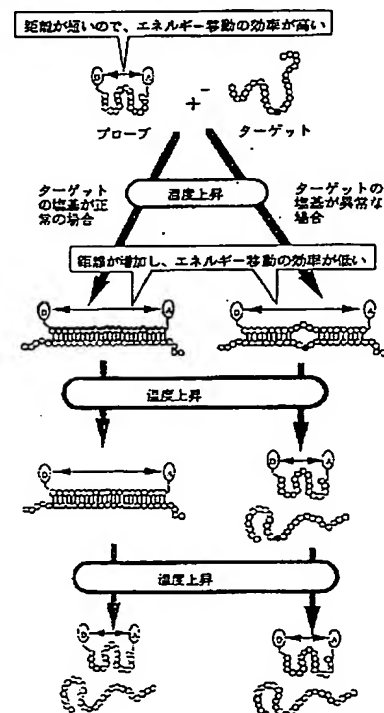
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 核酸の点変異の検出方法及び該方法を用いた遺伝子異常の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出することを目的とする。

【解決手段】 ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう一方で標識されているプローブを用い、該プローブをターゲット核酸と共に室温より高められた温度にて共存させて該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を測定することによりターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう一方で標識されているプローブを用い、該プローブをターゲット核酸と共に室温より高められた温度にて共存させて該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を測定することによりターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項2】 該点変異が特定配列の中心又は中心近傍に存在することを特徴とする請求項1に記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項3】 該二種類の蛍光色素が、フルオレセインとローダミンX、フルオレセインとテキサスレッド、フルオレセインとテトラメチルローダミン、及びフルオレセインとエオシンの組合せからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1又は2に記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項4】 該プローブ中の塩基配列が、15～19ヌクレオチドよりなることを特徴とする請求項1～3のいずれか一つに記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項5】 該プローブ中の塩基配列が、ターゲット核酸中の特定配列に相補的な配列のみから成ることを特徴とする請求項1～4のいずれか一つに記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項6】 該室温より高められた温度が45℃～65℃であることを特徴とする請求項1～5のいずれか一つに記載のターゲット核酸中に特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項7】 ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を特定する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう一方で標識されているプローブを用い、該プローブをターゲット核酸と共に共存させ、次いで、該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を、室温より高められた温度範囲にてなされる温度変化に応じて測定することによりターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項8】 該点変異が特定配列の中心又は中心近傍に存在することを特徴とする請求項7に記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項9】 該二種類の蛍光色素が、フルオレセイン

とローダミンX、フルオレセインとテキサスレッド、フルオレセインとテトラメチルローダミン、及びフルオレセインとエオシンの組合せからなる群から選ばれることを特徴とする請求項7又は8に記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項10】 該プローブ中の塩基配列が、15～19ヌクレオチドよりなることを特徴とする請求項7～9のいずれか一つに記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項11】 該プローブ中の塩基配列が、ターゲット核酸中の特定配列に相補的な配列のみから成ることを特徴とする請求項7～10のいずれか一つに記載のターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項12】 該室温より高められた温度範囲が、室温～80℃の範囲内にて選ばれることを特徴とする請求項7～11のいずれか一つに記載のターゲット核酸中に特定配列に存在する点変異を検出する方法。

【請求項13】 生体由来の試料を用いて、請求項1～12のいずれか一つに記載の方法により遺伝子異常を検出する方法。

【請求項14】 該遺伝子異常が、ガン遺伝子の異常であることを特徴とする請求項13に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】 遺伝子中に生じる突然変異などによる塩基配列の異常は、各種疾患、例えば遺伝病に関連しており、その解明のための研究が行われている。また、遺伝病のいくつかはその変異が特定されており、その診断が、その特定の変異を検出することにより行われている。

【0002】 突然変異などによる塩基配列の異常は、一般的には塩基配列読取技術により検出されている。塩基配列の異常はまた、塩基組成の違いにより生じる一本鎖の高次構造の違いを電気泳動パターンとして検出することができる (Sugamo, K. ら, Electrophoresis, vol. 16, No. 1, pp. 8-10, 1995)。

【0003】 3' 端をフルオレセインで標識しかつ5' 端をx-ローダミンで標識した16塩基のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、室温にて、プローブの一本鎖状態での定常発光と標的配列との二重鎖構造での定常発光の差を検出することによる、ファージDNA中に存在するそのオリゴヌクレオチドに相補的な標的配列を検出する方法が報告されている (Kay M. ら, Biochemistry 1995, 34, 285-292)。

【0004】 また、その両端に発光色素と吸収色素を結合したモレキュラービーコン (ターゲットに相補的なプローブとその両端に連結されたお互いに相補であるアームからなる) を用いて、リアルタイムで特定の核酸合成をモニターする方法が報告されている (Sanjay Tyagi

ら, Nature Biotechnology, vol 14, March 1996)。

【0005】

【発明の属する技術分野】本発明は、塩基配列の検出方法に関し、特に、塩基配列中に存在する変異の検出方法に関する。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、標的核酸中に存在する異常、特に、標的核酸中に存在する点変異を検出する方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう一方で標識されているプローブを用い、そしてさらに、該プローブをターゲット核酸と共に室温より高められた温度にて共存させて該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を測定することにより、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出することができることを見だし本発明を完成した。

【0008】本発明者はさらに、プローブとターゲット核酸が共存する状態で、高められた温度を所定の範囲内で変化させて上記の発光度の比を測定することにより、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異をさらに特異的かつ高感度で検出できることを見だし本発明を完成した。

【0009】上記したように、従来、その両端に蛍光色素と吸収色素を結合したモレキュラービーコン（ターゲットに相補的なプローブとその両端に連結されたお互いに相補であるアームからなる）が報告されている（Sanjay Tyagiら, Nature Biotechnology, vol 14, March 1996）。この文献には、このモレキュラービーコンを用いて特定の核酸配列を検出することが示されており、その原理は以下の通りであると考えられる。このモレキュラービーコン単独では、両端に存在するアーム同士で分子内二本鎖を形成することにより、色素同士が接近し共鳴エネルギー移動により蛍光色素の蛍光が消光する。一方、ターゲット核酸が存在すると、プローブとターゲット間で分子間二本鎖を形成することにより、プローブ内の二本鎖が壊されることにより色素間の距離が増し、その結果共鳴エネルギー移動が起きなくなりプローブは発光する。この発光の測定により、ターゲットの存在を知ることができる。モレキュラービーコンとしては、蛍光色素としてEDANS、吸収色素としてDABCYLを用いた、15ヌクレオチド長のプローブと5ヌクレオチド長のアーム（合計で25ヌクレオチド長）からなるモレキュラービーコンと35ヌクレオチド長のプローブと

8ヌクレオチド長のアーム（合計で51ヌクレオチド長）からなるモレキュラービーコンが開示されている。発光の検出は、蛍光色素（EDANS）のピーク波長（490nm）において行われている。

【0010】この文献には、上記モレキュラービーコンを用いて、特定の核酸の合成をモニターをする方法が開示されている。この文献はまた、一つの塩基の欠落やミスマッチを持つ核酸をターゲットにした場合に二本鎖が形成されないことを述べている。

10 【0011】しかしながら、上記のモレキュラービーコンがターゲット核酸との間において二本鎖を形成して発光するか分子内において二本鎖を形成して発光が消されるかは、モレキュラービーコン内のアーム間の親和性とモレキュラービーコンとターゲット間の親和性のバランスによると考えられる。すなわち、ターゲットに対してハイブリダイズするプローブの部分が長ければ、ターゲットとプローブ間にミスマッチがあったとしても、それ以外の相補的な部分間の親和性がアーム間の親和性より強い場合は、結果としてモレキュラービーコン内のアーム間の二重鎖が壊され発光する。従って、モレキュラービーコンにおいては、プローブ配列及びアーム配列の選択が非常に困難である。なお、上記文献においては、モレキュラービーコンを一つの塩基の欠落やミスマッチを持つ核酸の検出は室温（25℃）にて行っている。

20 【0012】また、上記文献において用いているモレキュラービーコンのアームは、5～8ヌクレオチド長である。一般に、塩基配列がランダムであるとしたら、任意の5ヌクレオチドの配列は、 $4^5 = 1024$ 個の塩基配列において1回出現することになる。よって、アーム配列としては互いに相補的な2つの配列があるので、いずれかのアームに相補的な配列は、512個の塩基配列において1回出現することが予想される。この長さ以上の長さを有する被検体の塩基配列は一般的なものである。従って、短い長さのアームを用いると、アームとターゲット間において二本鎖を形成し、誤った測定結果を生じる可能性がある。一方、アームを長くすると、ターゲット核酸に相補的なプローブを長くしなければならず、長いプローブがターゲットと二本鎖を形成したときの相補的な部分の親和性はより強くなり、ターゲットの塩基の欠落やミスマッチが存在しても、二本鎖の解離が起こらず、従って、塩基の点変異の検出は不十分となる。

30 【0013】さらに、プローブが長いと核酸分解酵素によって分解される可能性が大きくなり不都合である。

【0014】

【発明の実施の形態】これに対し、本願発明は、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう

一方で標識されているプローブを用い、該プローブをターゲット核酸と共に室温より高められた温度にて共存させて該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を測定することによりターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0015】そして上記構成をとることにより、上記したようなアーム間での親和性とプローブとターゲット間での親和性のバランスという問題、プローブが長くなることの問題等を生ぜずに、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出することが可能となった。

【0016】本発明の特徴の一つは、プローブとターゲット核酸を室温より高められた温度にて共存させることである。そして、本発明のもう一つの特徴は、一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を測定することである。これにより、本発明の方法は、簡便にそして高感度にて、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出することを可能としたのである。

【0017】本発明はまた、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を特定する方法において、ターゲット核酸中の該特定配列と相補的な塩基配列を有するプローブであって、該プローブの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が該二種類の蛍光色素のもう一方で標識されているプローブを用い、該プローブをターゲット核酸と共に共存させ、次いで、該一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度に対する該他の一方の蛍光色素の最大蛍光吸収波長における発光度の比を、室温より高められた温度範囲にてなされる温度変化に応じて測定することによりターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0018】上記の如く、本発明においては、発光度の比を温度変化に応じて測定することにより、さらに高感度にてターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出することが可能となったのである。

【0019】本発明の一つの特徴はまた、該点変異を特定配列の中心又は中心近傍に有するターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0020】また本発明の一つの特徴は、該二種類の蛍光色素が、フルオレセインとローダミン、フルオレセインとテキサスレッド、フルオレセインとテトラメチルローダミン、及びフルオレセインとエオシンの組合せからなる群から選ばれることをターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0021】本発明のさらなる特徴は、該プローブ中の塩基配列が、15～19ヌクレオチドよりなるターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0022】本発明のさらに一つの特徴は、該プローブの塩基配列が、ターゲット核酸中の特定配列に相補的な配列のみから成るターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0023】また、本発明の特徴の一つは、該室温より高められた温度が45℃～65℃であるターゲット核酸中に特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0024】さらに、本発明の特徴の一つは、室温より高められた温度範囲が、室温～80℃の範囲内にて選ばれるターゲット核酸中に特定配列に存在する点変異を検出する方法である。

【0025】(本発明の検出方法の原理) 本発明においては、ターゲット核酸の塩基配列に相補的であるオリゴヌクレオチドの両端を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を生じるドナー色素とアダプター色素でそれぞれ標識したものを、異常塩基配列の検出のためのプローブとして用いる(図1)。

【0026】本発明における点変異の検出法の原理を図2に示す。図に示すように、プローブ単独では、分子の熱ゆらぎや分子内における偶然の塩基対の形成等の原因のために曲がりくねった形状をしていると考えられる。そのため、プローブ分子内の色素がお互いに接近し、蛍光共鳴エネルギー移動を生じる。その結果、例えば、ドナー色素に対する励起光を当てた場合の、ドナー色素の最大発光波長(A nm)における発光度(X)に対するアクセプター色素の最大発光波長(B nm)における発光度(Y)は減少する。すなわち、両者の比(Y/X)が減少することになる。このことは、常温にて静置したプローブのドナー色素を励起した時の発光度を測定すると、ドナー色素からの発色がほとんどないこと、すなわちY/X値が大きいことより推測される(データは示さず)。

【0027】低温の水溶液中でプローブとターゲット核酸を混在させると、それぞれの塩基対が相補的であるため、プローブとターゲット間で塩基対を形成して二本鎖となる。二本鎖状態では、二重螺旋構造をとって膠着した構造となるため色素間の距離はプローブ単独の時よりも長くなる。従って、FRETは低下し、Y/X値は低下する。

【0028】水溶液の温度が上昇すると、塩基の熱運動が大きくなり塩素間の水素結合に勝るようになり、連続した塩基対の数の少なさに依存して二本鎖構造が崩れ始める。つまり、塩基対合が不完全なもの、即ちプローブと点変異を有するターゲット間の塩基対合は、塩基対合が完全なもの、即ちプローブと正常なターゲット間の塩基対合よりも低い温度で二本鎖がほどける。ほどけたプローブは、一本鎖状態となり、色素間の距離が短くなる。その結果、FRET効率が再び上がり、Y/X値が大きくなる。一方、ターゲットが正常な場合は、プローブはターゲットと塩基対を形成して二本鎖構造を保持し

ている。その結果、FRET効率は低いままであり、Y/X値は小さいままである。さらに温度を上昇させれば、プローブと正常ターゲット間の塩基対も壊され、二本鎖構造が崩れる。その結果、FRET効率が高くなり、Y/X値は大きくなる。このように、FRET効率は、プローブとターゲット間の塩基対に応じて異なった温度依存性を示す。従って、反応温度に対する、FRET効率、即ちY/X値から点変異の有無が検出できる。条件設定が行われた後は、所定の反応温度におけるエネルギー効率、Y/X値を測定することにより点変異の有無が検出できる。

【0029】FRETを測定できる色素間の距離は約10nm以内である。一方、連続した3個のヌクレオチドの長さは約1nmである。従って、プローブのヌクレオチド数が30を超えると、二本鎖形成後のFRETは見られなくなる。しかしながら、FRETの効率は色素間の距離の6乗に反比例するので、二本鎖状態においてFRETが完全に消失しなくても、一本鎖と二本鎖の状態では色素間の距離に違いがあればFRET効率の差が検出可能である。

【0030】さらには、この違いを種々の温度において測定することにより、ターゲットの塩基配列に塩基置換、欠落、挿入等の異常が生じているか否かが、より正確かつ高感度で検出可能となる。

【0031】(ターゲット核酸) 本発明の検出方法において用いるターゲット核酸は、その種類、長さ、存在状態は特に制限されず、DNA及びRNAのいずれも満身に用いることができる。DNAとしては、例えば、生体試料由来のDNA例えば抽出精製されたDNA、合成DNAのいずれも用いることができ、また、DNAの種類も、ゲノムDNA、cDNA、抽出精製されたDNA、断片にされたDNA、ベクター中に組み込まれたDNA等いずれも使用可能である。RNAとしては、生体試料由来のRNA例えば抽出されたRNA、合成RNAのいずれも用いることができ、また、RNAの種類も、mRNA、抽出精製されたRNA、断片にされたRNA等のいずれも使用可能である。

【0032】(プローブ) 本発明の方法において用いるプローブは、プローブ中のオリゴヌクレオチドの一端が蛍光共鳴エネルギー移動を生じる二種類の蛍光色素の一方で標識されかつ他の一端が二種類の蛍光色素のもう一方で標識されている限り特に制限されず、ターゲット核酸の塩基配列、反応温度等の条件に応じて任意に選択可能である。プローブの長さも特に制限されないが、好ましくは10~25オリゴヌクレオチド長、さらに好ましくは15~19ヌクレオチド長である。プローブが不必要に長いと、検出感度の向上は望めず、取り扱いが煩雑となるので好ましくない。また、プローブ中のオリゴヌクレオチドの両端に、ターゲットの特定塩基配列と相補的でない配列を含むことも可能であるが、該余分な配列

がターゲットの特定塩基配列以外の配列と塩基対を形成するので好ましくない。また、プローブ中のオリゴヌクレオチドとして、ホスホロチオエート化のように種々の核酸分解酵素により分解されないように化学修飾したオリゴヌクレオチドも使用可能である。

【0033】上記の如く、正常ターゲットの特定塩基配列に相補的な配列を有する本発明のプローブを用いて、ターゲット中の点変異を検出する方法を述べたが、本発明の方法においては、該点変異が、どのようなものであるかも検出可能である。

【0034】また、本発明の方法においては、さらに正常ターゲットの特定塩基配列に相補的な配列を有するプローブの代わりに、予想される特定の点変異を生じたターゲットの特定塩基配列に相補的なプローブを用いることにより、該点変異をより正確に検出できる。

【0035】ターゲット中の点突然変異を検出するためのプローブの例としては、以下のものを挙げることができるが、これらに限定はされない。なお、以下にはプローブのオリゴヌクレオチド部分のみを示す。

【0036】(1) 肝臓ガンに関する遺伝子p53の突然変異に対するプローブの例

下線は、現時点で特定されている、塩基配列中で突然変異が生じる塩基箇所を示した (Buchman, V.L. ら, Gen e, 70, 245-252 (1988) 及び Hsu, I.C., ら, Nature, 350, 427-428 (1991) 参照)。

【0037】5' -CGGAGGCCCAT-3' (配列表の配列番号1)

5' -CCGGAGGCCCATC-3' (配列表の配列番号2)

5' -ACCGGAGGCCCATA-3' (配列表の配列番号3)

5' -AACCGGAGGCCCATCCT-3' (配列表の配列番号4)

5' -GAACCGGAGGCCCATCCTC-3' (配列表の配列番号5)

5' -TGAACCGGAGGCCCATCCTCA-3' (配列表の配列番号6)

5' -ATGAACCGGAGGCCCATCCTCAC-3' (配列表の配列番号7)

及び、それに対する相補的な以下の配列もプローブとして使用可能である。

【0038】5' -ATGGGCCTCCG-3' (配列表の配列番号8)

5' -GATGGGCCTCCGG-3' (配列表の配列番号9)

5' -GGATGGGCCTCCGGT-3' (配列表の配列番号10)

5' -AGGATGGGCCTCCGGTT-3' (配列表の配列番号11)

5' -GAGGATGGGCCTCCGGTTTC-3'

(配列表の配列番号12)

5' -TGAGGATGGGCCTCCGGTTCA-
3' (配列表の配列番号13)

5' -GTGAGGATGGGCCTCCGGTTCA
T-3' (配列表の配列番号14)

(2) 膵臓ガンに関する遺伝子K i - r a sの突然変異
に対するプローブの例

下線は、現時点で特定されている、塩基配列中で突然変
異が生じる塩基箇所を示した (Shimizu, K. ら, Natur
e, 304, 497-500 (1983) 及び Hruban, R.H. ら, Am. J. 10
Pathol, 143, 545-554 (1993) 参照)。

【0039】5' -AGCTGGTGGCG-3' (配
列表の配列番号15)

5' -GAGCTGGTGGCGT-3' (配列表の配
列番号16)

5' -GGAGCTGGTGGCGTA-3' (配列表
の配列番号17)

5' -TGGAGCTGGTGGCGTAG-3' (配
列表の配列番号18)

5' -TTGGAGCTGGTGGCGTAGG-3' 20
(配列表の配列番号19)

5' -GTTGGAGCTGGTGGCGTAGGC-
3' (配列表の配列番号20)

5' -AGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGC
A-3' (配列表の配列番号21)

及び、それに対する相補的な以下の配列もプローブとし
て使用可能である。

【0040】5' -CGCCACCAGCT-3' (配
列表の配列番号22)

5' -ACGCCACCAGCTC-3' (配列表の配 30
列番号23)

5' -TACGCCACCAGCTCC-3' (配列表
の配列番号24)

5' -CTACGCCACCAGCTCCA-3' (配
列表の配列番号25)

5' -CCTACGCCACCAGCTCCAA-3'
(配列表の配列番号26)

5' -GCCTACGCCACCAGCTCCAAC-
3' (配列表の配列番号27)

5' -TGCCTACGCCACCAGCTCCAAC 40
T-3' (配列表の配列番号28)

(ドナー色素及びアクセプター色素) 本発明の方法にお
いて用いるドナー色素及びアクセプター色素の組合せ
は、蛍光共鳴エネルギー移動を生じる蛍光色素の組合せ
であれば特に制限されない。例えば、ドナー色素として
は、フルオレセイン、アミノフルオレセイン、アミノア
セトアミドメチルフルオレセイン、アミノアセトアミド
フルオレセイン、ルシファーイエローを挙げることがで
き、アクセプター色素としては、テトラメチルローダミ
ン、ローダミンX、テキサスレッド、エオシン、エリス 50

ロシンを挙げることができる。ドナー色素とアクセプタ
ー色素の組合せは限定されないが、例えば、フルオレセ
インとローダミンX、フルオレセインとテキサスレッ
ド、フルオレセインとテトラメチルローダミン、及びフ
ルオレセインとエオシンが挙げられ、分光特性の点より
フルオレセインとローダミンXの組合せが好ましい。

【0041】本発明で用いるプローブは、オリゴヌクレ
オチドの一端に上記のドナー色素を、他の一端に上記の
アクセプター色素を結合したものである。オリゴヌクレ
オチドの末端への上記の色素の結合方法は、化学合成法
を挙げることができる。

【0042】具体的には、以下の方法を挙げることがで
きるがこれに限定はされない。フォスフォロアミダイト
法によるDNA合成機でオリゴヌクレオチドを化学合成
する際に、FITCを導入したカラムである3'-フル
オレセイン-ON-CPG (東洋紡) を用いることにより、
3'末端をフルオレセインで直接ラベルすることが
できる。また、アミノモディファイヤーII (東洋紡) を
使用することによりDNA合成機でオリゴヌクレオチド
の5'末端に直接アミノ基を導入し、その後XRICとアミノアシル化反応を起こさせることにより、オリ
ゴヌクレオチドの5'末端をローダミンXでラベルする
ことができる。

【0043】(プローブとターゲット核酸の反応条件)
本発明の方法において用いる、上記プローブとターゲッ
ト核酸のハイブリダイゼーション条件は、通常の核酸の
ハイブリダイゼーション条件が満足に使用できる。例え
ば、10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl
₂を含む溶液中で25 nM のプローブと150 nM のターゲッ
ト核酸を混合して、一定の温度に30分間放置するとい
う条件を挙げることができるが、これに限定されない。

【0044】上記ハイブリダイゼーションの温度は、用
いるプローブの長さ、塩基配列、ターゲットの塩基配列
等に応じ適宜選択されるものである。

【0045】本発明の方法において、温度を固定してプ
ローブとターゲットを反応させる場合は、反応温度は、
30~80℃であり。反応温度は、正常ターゲットと異
常ターゲットの差が特に明瞭に検出できるので、30~
70℃が最も好ましい。特に15~19ヌクレオチドの
プローブを用いる場合は、50~60℃にて反応を行う
のが好ましい。

【0046】本発明の方法において、反応温度を所定範
囲内で変化させて発光度を測定する場合は、反応温度
は、20~80℃である。反応温度は、正常ターゲット
と異常ターゲットの差が特に明瞭に検出できるという点
で、30~70℃の範囲にて変化させるのが最も好まし
い。特に15~19ヌクレオチドのプローブを用いる場
合は、30~70℃にて反応を行うのが好ましい。

【0047】(発光の検出) 本発明の方法において用い
る発光の検出は、通常の発光検出方法が満足に使用でき

る。例えば、蛍光色素としてフルオレセインとローダミンXを用いた場合は、494 nm付近の励起光により励起し、500 nmから650 nmまでの波長範囲で蛍光スペクトルを測定することにより行うことができる。励起光の波長及び測定する蛍光スペクトルの範囲は、用いる蛍光色素及び測定機器の光波長選択精度に応じて選択される。または、494 nm付近の光によりフルオレセインを励起し、フルオレセインの蛍光ピーク波長である518 nmにおける蛍光強度とローダミンXの蛍光ピーク波長である609 nmにおける蛍光強度を測定することにより行う。または、420~500 nmの範囲において適当な波長幅のある光でフルオレセインを励起して、蛍光を560 nm付近の波長で分光光学系により2つの蛍光成分に分離して、500 nm~560 nmの蛍光成分と560 nm以上の蛍光成分の蛍光強度をおおの測定することにより行う。これらの波長は、用いる蛍光色素及び分光光学系の波長特性に応じて選択される。

【0048】(生体試料からのターゲット核酸中の点突然変異の検出方法) 生体試料からのターゲット核酸を用いた点突然変異の検出方法を以下に記すが、これに限定はされない。

【0049】生体試料としては、特に制限されず、被験者からの分泌液、血液、排泄物、組織等が満足に使用できる。

【0050】(1) 生体試料からの核酸の抽出

生体試料から核酸の抽出は、核酸、たとえばDNA又はRNAの通常の抽出法が満足に使用できる。例えば、以下に記載の方法を挙げることができるが、これには限定されない。例えば、血液からDNAを抽出する場合には、血液を1000回転、15分間遠心し、沈殿をPBSで3回洗浄し、水性成分を除いた後、100 µg/mlのプロテアーゼKにより蛋白質を分解する。50℃、3時間保温した後、等量の水飽和フェノールを加え、3000回転、10分間室温で遠心する。フェノールを除き、再び水飽和フェノールを加える。遠心してフェノール層を除いた後に、2倍量のクロロホルムを加え3000回転で2分間遠心する。クロロホルム処理操作を3回繰り返した後に、100倍量の50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA、10 mM NaClに対して透析を数時間行う。20 µg/mlのRNase Aを加え、37℃、30分間保温した後に、上記のフェノール・クロロホルム処理を繰り返す。

【0051】(2) PCRによる増幅

突然変異の可能性のある塩基配列を含む遺伝子の部分を増幅する。例えば、PCR法を用い、突然変異があると予想される特定配列の領域を挟む2種のプライマーを用いて増幅することができる。PCR法による増幅は、通常のPCR法において用いられている方法が満足に使用できる。(たとえば、Mullis, K.B. and Faloona, F.A.,

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155, 335-350, 1987参照)

もし、ターゲット核酸がRNAである場合は、最初に逆転写酵素を用いてRNAからDNAを合成し、次いで上記のPCR法により増幅可能である。(例えば、Bernards, A.ら, *Mol. Cell. Biol.*, 7, 3231-3236, 1987参照)。

【0052】対照としては、正常な塩基配列を持った核酸を合成等により調製しておく。

【0053】(3) プローブとターゲット核酸とのハイブリダイゼーション

上記の方法により増幅したターゲット核酸又は対照の正常核酸の溶液に、本発明の蛍光標識したプローブを加え、上記のハイブリダイゼーション条件に従って反応を行う。

【0054】(4) 蛍光強度の比(FRET効率)の測定

用いるプローブ等に応じて選択した、適当な所定の温度にて、蛍光分光光度計を用いて蛍光スペクトルを測定する。温度は、プローブのオリゴヌクレオチドの長さが15-merの場合は50℃付近が、19-merの場合は60℃付近が適当である。

【0055】ドナー色素の光励起により測定した蛍光スペクトルに基づいて、ドナー色素の最大発光波長(A nm)における発光度(X)に対するアクセプター色素の最大発光波長(B nm)における発光度(Y)、即ち発光度の比(Y/X)を求める。生体試料由来の核酸を用いた結果を、正常核酸を用いた結果と比較することにより、被検核酸が点突然変異を持つか否かを診断する。

【0056】本発明の方法を用いて生体試料を測定する場合は、生体組織を用いることもまた生体試料より抽出した核酸を用いることもできる。生体組織を用いる場合は、生体試料をプレートその他の支持体に固定し、目的DNA部分を、例えば Haase, A.T.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4971-4975 (1990)に記載の*in situ* PCR法により増幅し、次いで本発明のプローブを含んだ反応液を加え、昇温し、励起光を当てて、発する蛍光を測定すればよい。また、生体試料より抽出された核酸を用いる場合は、必要に応じ増幅した核酸を含む液に本発明のプローブを含んだ反応液を加え、昇温し、励起光を当てて発する蛍光を測定すればよい。

【0057】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されない。

【0058】

【実施例】

(実施例1) プローブの塩基配列の長さ二本鎖形成により生じる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率の変化

以下の通りの2種類の蛍光色素を結合させた(5'末端

にフルオレセイン (F)、3' 末端にローダミンX (R_x) が結合されている) 種々の長さのプローブを、株式会社ベックスに合成を委託して得た。

【0059】プローブ1 (19mer)

R_x-TGAGCGGATAACAATTTCA-F

(配列表の配列番号29)

プローブ2 (27mer)

R_x-ATTGTGAGCGGATAACAATTTCA
ACACA-F (配列表の配列番号30)

プローブ3 (40mer)

R_x-GAATTGTGAGCGGATAACAATTT
TCACACAGGAACAGCTA-F (配列表の
配列番号31)

プローブ4 (50mer)

R_x-TGTGTGGAATTTGTGAGCGGATA
ACAATTTTCACACAGGAACAGCTAT
GAC-F (配列表の配列番号32)

合成は、前記したフォスフォアミダイト法を用いて行
った。

【0060】用いたターゲット核酸は、人工合成一本鎖 20
核酸であり、株式会社ベックスに合成を委託して入手し
た。塩基配列は、以下の通りであり、前記のプローブ4
に相補的である。

【0061】3'-GTCATAGCTGTTTCCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAA
TTCCACACA-5' (配列表の配列番号33)

上記各プローブと上記ターゲット核酸を、ターゲット：
プローブ比が0:1、1:10、1:5、1:2、1:
1、2:1、3:1になるようにして、10 mMTris-HCl
(pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂ 中で混合し、25 30
℃にてハイブリダイゼーションを行った。60分間静置
後、蛍光分析機 (日立社製、モデル850) を用いて、
490 nmで励起し、500 nm~650 nmの蛍光ス
ペクトルを測定した。

【0062】FRET効率は、波長609 nmと518
nmの蛍光強度の比を求め、ターゲット:プローブの分
子数比に対してプロットすることにより確認した。結果
を図3に示す。

【0063】蛍光強度比は、どの長さのプローブにおい
ても、ターゲット:プローブ比に応じて同じようなパター 40
ンで変化した。

【0064】ターゲット核酸の存在しないプローブ単独
の条件下では、蛍光強度比が最大となった。ターゲット
核酸の存在下では、FRETはターゲットの分子数に伴
って、すなわちプローブとターゲットにより形成される
二本鎖が増えるに従って減少した。プローブとターゲッ
トが同数存在するときが、蛍光強度比が最も減少し、プ
ローブ数に対してターゲット数が過剰になっても蛍光強
度比は変化しなかった。

【0065】これらの結果は、蛍光色素間の距離はその 50

間に存在する塩基数に依存せず、一本鎖状態においては
同様の状態にあることを示している。そして、プローブ
がターゲット核酸にハイブリダイズして二本鎖が形成さ
れると、蛍光色素間の距離が大きくなり、結果として蛍
光強度比が減少したことを示している。

【0066】この結果より、プローブは、一本鎖状態に
あると凝集しているが、ターゲットとハイブリダイズし
た状態では直線状の構造を取っていると考えられる。

【0067】(実施例2) 正常又は異常ターゲットと
10 のハイブリダイゼーション

(2-1) プローブの調製

プローブ5 (15mer): 5'-GATAACAAT
TTCACA-3' (配列表の配列番号34) の塩基配
列からなる塩基数15のオリゴヌクレオチドを株式会社
ベックスに合成を委託し入手した。

【0068】実施例1と同様にして、このオリゴヌクレ
オチドの5' 端をローダミンXで、3' 端をフルオレセ
インで標識し、蛍光色素標識プローブとした (15-merプ
ローブ)。

【0069】(2-2) ターゲット核酸の調製

正常ターゲットとして、5'-TTCCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCA-3' (配列表の配
列番号35) の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを
株式会社ベックスに合成を委託し入手した (ターゲット
(T) とする)。

【0070】異常ターゲットとして、上記配列の塩基記
号Tを、A、G又はCに換えたもの、及びTを欠落させ
たものを株式会社ベックスに合成を委託し入手した (そ
れぞれ、ターゲット(A)、(G)、(C) 及び(D)
とする (それぞれ、配列表の配列番号36、37、3
8、39))。

【0071】(2-3) プローブとターゲットのハイブ
リダイゼーションによるFRET効率

上記の各ターゲット存在下でのプローブのFRET効率
を測定した。

【0072】緩衝液 (10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、50 mM K
Cl、1.5 mM MgCl₂) 中に、上記プローブを25 nMに、
そして上記ターゲットの一つを150 nMになるように
溶解し、次いで、30℃で1時間保温した。その後、4
90 nmの励起光により発光された蛍光スペクトルを測
定した。上記の各ターゲットについてこの操作を行った
ところ、ターゲットの塩基配列に応じてスペクトルのパ
ターンが異なっていることが判った。

【0073】FRETを定量化するために、蛍光スペク
トルのピーク波長である518 nm (フルオレセインの
最大蛍光波長) と609 nm (ローダミンXの最大蛍光
波長) との蛍光強度の比 (609 nm/518 nm) を
求めた。

【0074】種々の温度におけるプローブの蛍光強度比
の値を、正常又は各種の異常ターゲットのおのおのとの

共存下で検討した。その結果を図 5 に示す。これより、50℃付近において、異常ターゲットでは、その塩基異常の種類に関わらず一定の蛍光強度比を示した。そして、50℃付近においては、異常ターゲットと正常ターゲットを用いた場合の間において、明らかな違いが認められた。従って、この 15-mer プローブを指示薬とした場合、一点突然変異による塩基配列異常は、50℃付近における FRET 測定により検出できることが判った。

【0075】(実施例 3) 19-mer プローブを用いた、一点突然変異の検出

5' 端をローダミン X で、3' 端をフルオレセインで標識した、5'-CGGATAACAATTTTCACACA-3' (配列表の配列番号 40) の塩基配列からなる塩基数 19 のオリゴヌクレオチド (プローブ 6 (19mer)) をプローブとして、実施例 2 と同じターゲット核酸を用い、実施例 2 と同様にして、正常又は異常ターゲットを用いた場合の FRET を求めた。結果を図 6 に示す。

【0076】609nm/518nm の蛍光強度比は、40℃において正常及び異常ターゲット間で同様の値を示したが、60℃においては、異常ターゲットではその塩基異常の種類に関わらず一定の値を示しかつ正常ターゲットとの間に明らかな違いが認められた。

【0077】従って、この 19-mer プローブを指示薬とした場合、一点突然変異による塩基配列異常は、60℃付近における FRET 測定により検出できることが判った。

【0078】(実施例 4) プローブに対するターゲット核酸の濃度比の影響

点突然変異の検出薬としてのプローブの評価において重要な要因である、プローブのターゲット塩基配列依存的な FRET の解消がプローブに対するターゲットの濃度比によりどのように影響されるかについて検討した。

【0079】プローブとしては、実施例 2 と同じプローブ (プローブ 5 (15mer-プローブ)) を用い、ターゲット核酸としては、実施例 2 と同じターゲット核酸を用いた。反応温度は、前記実験により、15-mer プローブを用いた場合に異常検出能が最も高いと判った 50℃を用いた。ターゲット/プローブ濃度比が 0.003~100 になるように、適当な量のターゲット核酸を、20nm のプローブを含む緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) 中に加えて、50℃にてハイブリダイゼーションを行い、30 分間静置後、蛍光スペクトルを測定し、609nm/518nm の蛍光強度比 (FRET 効率) を求めた。結果を図 7 に示す。FRET 効率は、ターゲット/プローブ比が、0.1 までは、正常及び異常ターゲット間においてほとんど差は見られなかった。一方、ターゲット/プローブ濃度比が 0.3 では、正常ターゲットを用いた場合は FRET 効率が減少したのに対し、異常ターゲットを用いた場合は変化がみられなかった。ターゲット濃度がプローブ濃度

に対して非常に大きくなると、異常ターゲットにおいても FRET 効率の減少が見られた。異常ターゲットを用いた場合、ターゲット/プローブ濃度比の増加に伴う FRET 効率の減少傾向は、塩基異常の種類により異なっており、T→G 置換が最も大きく、T→C 置換では濃度比が 100 でもほとんど減少しなかった。これらの結果は、15-mer プローブを用いた 50℃における FRET 効率の測定により、ターゲット中に存在する一塩基の異常を、0.3~30 のターゲット/プローブ濃度比の範囲において検出できることを示している。

【0080】

【発明の効果】本発明の方法は、ターゲット核酸中の特定配列に存在する点変異を検出するのに有用である。また、本発明の方法は、極めて簡便であり、かつ検査時間が短いので非常に有用である。さらに本発明においては、温度依存的な FRET 効率を測定することにより、優れた検出感度及び検出特異性を提供できる。

【0081】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 11

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸、合成 DNA

配列

CGGAGGCCCAT

配列番号: 2

配列の長さ: 13

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸、合成 DNA

配列

CCGGAGGCCCATC

配列番号: 3

配列の長さ: 14

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸、合成 DNA

配列

ACCGGAGGCCCATATA

配列番号: 4

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸、合成 DNA

配列

A A C C G G A G G C C C A T C C T

配列番号 : 5

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

G A A C C G G A G G C C C A T C C T C

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

T G A A C C G G A G G C C C A T C C T C A

配列番号 : 7

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

A T G A A C C G G A G G C C C A T C C T C A C

配列番号 : 8

配列の長さ : 11

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

A T G G G C C T C C G

配列番号 : 9

配列の長さ : 13

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

G A T G G G C C T C C G G

配列番号 : 10

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

G G A T G G G C C T C C G G T

配列番号 : 11

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

A G G A T G G G C C T C C G G T T

配列番号 : 12

配列の長さ : 19

10 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

G A G G A T G G G C C T C C G G T T C

配列番号 : 13

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

20 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

T G A G G A T G G G C C T C C G G T T C A

配列番号 : 14

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

30 配列

G T G A G G A T G G G C C T C C G G T T C A T

配列番号 : 15

配列の長さ : 11

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

A G C T G G T G G C G

40 配列番号 : 16

配列の長さ : 13

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

G A G C T G G T G G C G T

配列番号 : 17

配列の長さ : 15

50 配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GGAGCTGGTGGCGTA

配列番号：18

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TGGAGCTGGTGGCGTAG

配列番号：19

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTGGAGCTGGTGGCGTAGG

配列番号：20

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GTTGGAGCTGGTGGCGTAGGC

配列番号：21

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

AGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCA

配列番号：22

配列の長さ：11

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CGCCACCAGCT

配列番号：23

配列の長さ：13

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ACGCCACCAGCTC

配列番号：24

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

10 配列

TACGCCACCAGCTCC

配列番号：25

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CTACGCCACCAGCTCCA

20 配列番号：26

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCTACGCCACCAGCTCCAA

配列番号：27

配列の長さ：21

30 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GCCTACGCCACCAGCTCCAAC

配列番号：28

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TGCCTACGCCACCAGCTCCAAC

配列番号：29

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

50 配列

21

22

ACTTTAACAATAGGCGAGT

配列番号：30

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ACACACTTTAACAATAGGCGAGTGTTA

配列番号：31

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGAGT
GTTAAG

配列番号：32

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGC
GAGTGTTAAGGTGTGT

配列番号：33

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTG
TCCTTTGTCGATACTG

配列番号：34

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GATAACAATTTTACA

配列番号：35

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA

配列番号：36

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCCTGTGTGAAAATGTTATCCGCTCA

配列番号：37

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCCTGTGTGAAAGTGTTATCCGCTCA

配列番号：38

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCCTGTGTGAAACTGTTATCCGCTCA

配列番号：39

配列の長さ：26

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTCCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCA

配列番号：40

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

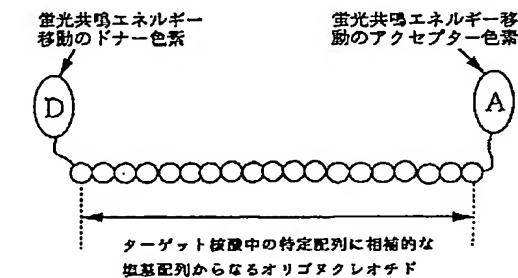
CGGATAACAATTTACACACA

【図面の簡単な説明】

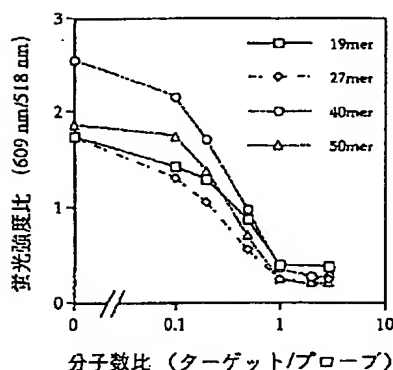
【図1】本発明の方法で用いる蛍光二重標識オリゴヌクレオチドプローブを示したものである。ターゲット核酸中の特定配列に相補的な塩基配列から成るオリゴヌクレオチドの一端に蛍光共鳴エネルギー移動のドナー色素が連結され、他の一端に蛍光共鳴エネルギー移動のアクセプター色素が連結されている。好ましくは、ターゲット核酸中の点変異の位置は、本発明のプローブの中央にくる。

【図2】本発明の検出方法の概念を表した図である。

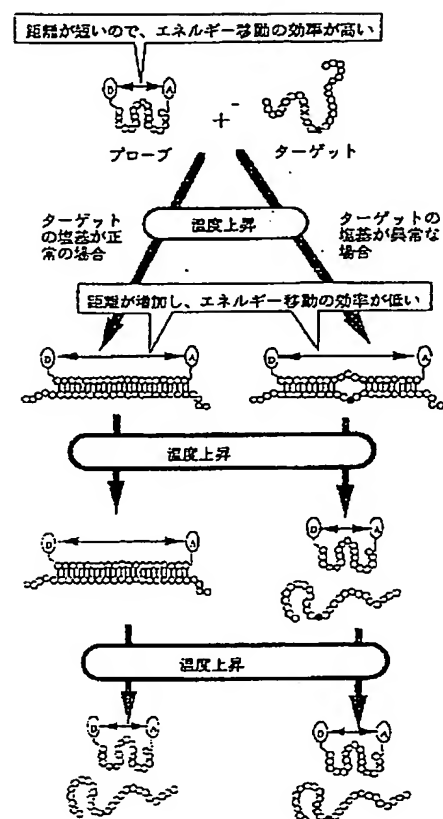
【図1】



【図3】



【図2】



【図3】本発明の方法における、FRET効率に対するプローブの長さ及びターゲット／プローブの分子数比の影響を検討した図である。

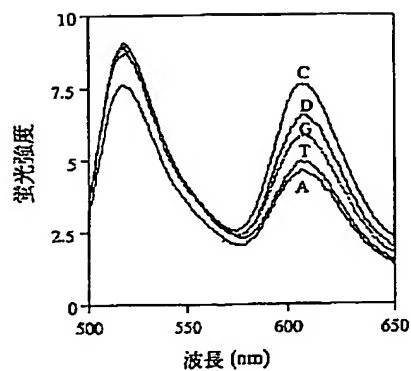
【図4】正常又は異常ターゲットとプローブ間で二本鎖形成した後の、蛍光スペクトル図である。図中の、Tは正常ターゲットであり、A、G、Cは、Tがそれぞれの塩基に置換している異常ターゲットであり、Dは、塩基Tが欠失している異常ターゲットである。

【図5】本発明の方法において、種々の温度条件下、正常又は異常ターゲットと15-merプローブを共存させた場合のFRET効率を検討した図である。

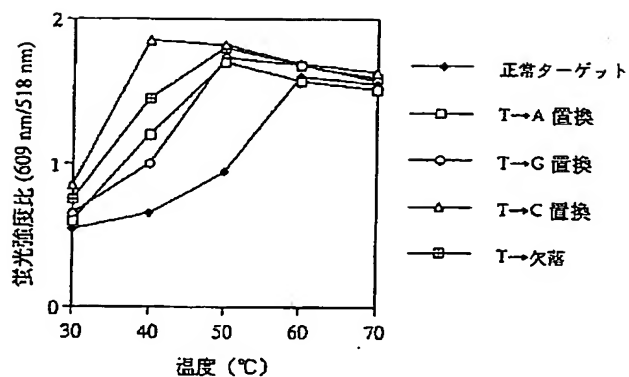
【図6】本発明の方法において、種々の温度条件下、正常又は異常ターゲットと19-merプローブを共存させた場合のFRET効率を検討した図である。

【図7】本発明の方法におけるFRET効率に対するターゲット／プローブの濃度比の影響を、正常ターゲット及び異常ターゲットを用いて検討した図である。

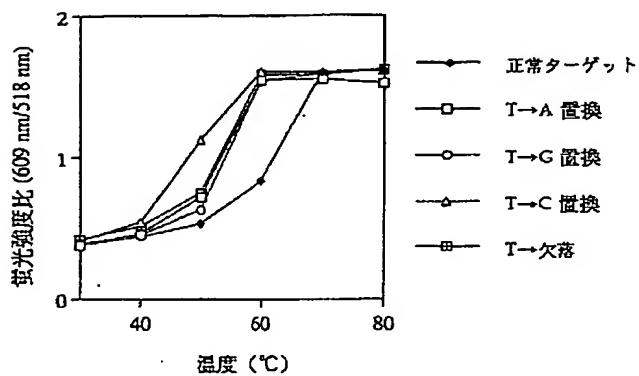
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

